

# **ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ NO В МЕХАНИЗМАХ АКТИВАЦИИ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ПОРЫ НА МОДЕЛИ ИШЕМИИ- РЕПЕРФУЗИИ ИЗОЛИРОВАННОГО СЕРДЦА**

**Шиманская Т.В., Надточий С.Н., Сагач В.Ф.**

*Институт физиологии им.А.А.Богомольца НАН Украины, г.Киев*

In experiments on isolated hearts of guinea-pigs on the model of ishaemia - reperfusion the role of NO in the mechanisms of activation mitochondrial permeability transition pore was investigated. It has been shown that postreperfusion disturbances of cardiac contractility, tone of the coronary vessels and heart rate, as well as noneffective oxygen utilization by the heart tissue were due to an opening of mitochondrial permeability transition pore. In addition there was a stable agent in reperfusion solution, that was registered by the spectrophotometry method on the wave length 250 nM. We suggest that the registered factor, released from mitochondria under an opening of mitochondrial permeability transition pore is the marker of its opening.

The heart and oxygen metabolism disturbances, stimulated by global 20 min ischaemia and reperfusion, were essentially decreased by a preliminary application (10 min) of either aminoguanidine ( $10^{-5}$  M, the blocker of inducible NO-synthase), or sodium nitroprusside ( $10^{-4}$  M, the NO donor). It was accompanized by a decrease the amplitude of optical density absorption peak in reperfusion solution in both cases (aminoguanidine- 46%, sodium nitroprusside – 62% vs control). A decrease in the factor concentration gives evidence for depression of the activation of the mitochondrial permeability transition pore.

Thus, a preliminary application the NO donor, as the blocker of inducible NO-synthase prevented to some extent postreperfusion injuries due to inhibition of activation the mitochondrial permeability transition pore. The mechanism of that influence may be different.

В настоящее время предметом активного обсуждения стал вопрос влияния оксида азота на активацию митохондриальной поры (МП). Известно, что реперфузионные повреждения сердца связаны с образованием митохондриальной поры и действием тех агентов, которые выделяются при этом в цитозоль [1,2]. Свободные кислородные радикалы, высвобождающиеся при открытии МП [9] легко связываются с внутриклеточным NO и инактивируют его, образуя пероксинитрит. Последний путем окисления тиоловых групп белков в свою очередь может приводить к открытию МП [5]. Целью настоящего исследования было изучение роли оксида азота в механизмах открытия митохондриальной поры в условиях реперфузии ишемизированного сердца.

### *Материалы и методы исследования*

Эксперименты выполнены на изолированных сердцах морских свинок массой 350-450 г, которые перфузировали по методу Лангендорфа при постоянном давлении и аэрации карбогеном (95% O<sub>2</sub> и 5% CO<sub>2</sub>) раствором Кребса – Хензелейта следующего состава (в ммоль/л): NaCl - 118; KCl - 4,7; MgSO<sub>4</sub> - 1,2; NaHCO<sub>3</sub> - 24; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - 1,2; глюкоза - 10; CaCl<sub>2</sub> - 2,5. Развиваемое давление в левом желудочке и его первую производную измеряли тензодатчиком и регистрировали на многоканальном поликардиографе “Мингограф-82” (Элема, Швеция). Скорость коронарного потока оценивали по объёму оттекающего от сердца перфузионного раствора за 1 мин. Напряжение кислорода в притекающем и оттекающем от сердца растворе измеряли с помощью газоанализатора BMS 3 Mk 2. Потребление кислорода рассчитывали по методу Neely, за кислородную стоимость работы сердца принимали соотношение потребления O<sub>2</sub> и развиваемого давления с учетом частоты сердечных сокращений. Для оценки открытия МП и выхода неидентифицированного фактора [3] проводили спектрофотометрический анализ проб на спектрофотометре СФ-46. Ишемию моделировали посредством полной остановки сердца на 20 мин, реперфузию отслеживали в течение 40 минут. Донор NO нитропруссид Na и блокатор синтеза NO аминоксидин (SIGMA) в дозе 10<sup>-4</sup> М и 10<sup>-5</sup> М соответственно перфузировали 10 мин, затем моделировали ишемию. Статистическую обработку данных производили разностным методом с использованием критерия Стьюдента.

*Результаты и их обсуждение.* Полученные результаты свидетельствуют, что 20-минутная тотальная ишемия сердца и последующая реперфузия приводили к развитию существенных нарушений кардиодинамики и сократительной функции миокарда. Уже на 5-й минуте реперфузии давление в левом желудочке достоверно уменьшалось на 28% (до 45,7±3,8 мм рт.ст., P<0,001), а на 40-й мин составляло 48,5% относительно исходного значения. Показатели сократительной активности миокарда  $dP/dt_{\max}$  и  $dP/dt_{\min}$  в этот период снижались до 65% и 45% (до ишемии - соответственно 1182 ± 49 мм рт.ст./с и 1037±54 мм рт.ст./с), а коронарный поток уже на 15-й мин реперфузии достоверно уменьшался и к концу наблюдения составлял 68% исходного уровня (9,5±1,1 мл/мин, P<0,006). С началом реперфузии миокарда отмечали существенные нарушения сердечного ритма: за первые 5 минут количество экстрасистол составляло 250±57 единиц (P<0,002). Кислородная стоимость работы сердца постепенно увеличивалась, к 40-й мин достигая 183%, P<0,01.

При реперфузии на фоне блокады индуцибельной NO-синтазы аминоксидином давление постепенно снижалось и к 40 мин составляло 62% (в контрольной серии - 48%). Коронарный поток имел аналогичную динамику изменений как и в контрольной серии. Показатели сократительной активности миокарда  $dP/dt_{\max}$  и  $dP/dt_{\min}$  к концу

наблюдения (40 мин) составляли соответственно 64% и 69% исходных величин. Кислородная стоимость работы достоверно увеличивалась на 58% (в контрольной серии - на 83%). Таким образом, реперфузия сердца на фоне блокады синтеза оксида азота сопровождалась несколько менее значительными нарушениями кардиодинамики, сократительной активности миокарда и кислородного обмена, чем в контрольной серии экспериментов. Ранее мы показали [1,2], что в первые минуты реперфузии сердца из митохондрий в оттекающий раствор выделяется не идентифицированный фактор. Этот фактор определялся нами по увеличению оптической плотности поглощения в ультрафиолетовой области спектра на  $\lambda = 250$  нм и служил маркером открытия митохондриальной поры. В условиях предварительного введения аминогуанидина амплитуда пика поглощения оптической плотности при реперфузии составляла 46% относительно контроля. Полученный результат свидетельствовал о том, что блокада индуцибельной NO-синтазы благоприятно влияла на восстановление функции сердца после ишемии.

Перфузия изолированного сердца раствором донора оксида азота нитропруссидом Na в течение 10 мин оптимизировала работу сердца и кислородный обмен. Небольшое снижение давления в левом желудочке (с  $70,1 \pm 8,9$  мм рт.ст. до  $64,8 \pm 9,9$  мм рт.ст.,  $P < 0,02$ ) на фоне увеличения индекса сократимости Верагута и коронарного потока соответственно с  $80,8 \pm 4,5$  сек<sup>-1</sup> до  $92,2 \pm 6,6$  сек<sup>-1</sup>,  $P < 0,014$  и с  $13,9 \pm 1,1$  мл/мин до  $14,5 \pm 1,1$  мл/мин,  $P < 0,013$  сопровождалось достоверным снижением кислородной стоимости работы сердца на 24%. Последующая 20-мин ишемия и реперфузия не приводили к развитию тех значительных нарушений кардиодинамики и сократительной функции, что наблюдались в контрольной серии. Аритмия сердца практически отсутствовала. На 5 мин реперфузии регистрировали достоверное снижение давления в левом желудочке (на 24%) и его первой производной (на 32% и 30%) относительно уровня до ишемии. Кардиодепрессорный эффект сопровождался снижением кислородной стоимости работы миокарда на 35%. В последующий период наблюдения показатели кардиодинамики относительно стабилизировались, а величина индекса Верагута в этот период даже превышала исходные цифры. Увеличение кислородной стоимости работы сердца было менее существенным (до 153%) по сравнению с контрольной серией (до 183%). Таким образом, перфузия донора оксида азота нитропруссидом Na также повышала резистентность миокарда к действию ишемии-реперфузии. Это согласовалось и с существенным снижением амплитуды пика поглощения (62% относительно контроля), что говорило об уменьшении концентрации фактора, выделяющегося из митохондрий, и, следовательно, об угнетении процессов открытия МП. Полученные результаты свидетельствовали, что предварительная перфузия донора окиси азота в дозе  $10^{-4}$  М существенно

уменьшала постреперфузионные нарушения функции сердца и кислородного обмена. Вероятно в данной концентрации NO выступала как ингибитор открытия митохондриальной поры. Известно, что именно NO предотвращает развитие оксидативного стресса и делает клетки резистентными к повреждению [8]. Этот эффект NO (в концентрациях до 1мкМ) может быть обусловлен и прямым ингибирующим воздействием на открытие поры [5] - NO инактивирует каспазы, блокируя тем самым апоптоз [7]. При концентрациях NO более 10 мкМ, наблюдается депрессия синтеза АТФ и нитрозилирование тиоловых (-SH)-групп митохондриальных белков, что в свою очередь приводит в открытию МП [8].

Таким образом, как предварительное введение донора NO, так и блокада индуцибельной NO-синтазы в определенной степени предотвращали развитие постреперфузионных нарушений деятельности сердца и кислородного обмена вследствие угнетения открытия митохондриальных пор. Это подтверждалось и уменьшением амплитуды пика оптической плотности поглощения реперфузионного раствора в обоих случаях. Вероятно, механизм этого влияния различен.

### *Литература*

1. Сагач В.Ф., Дмитрієва А.В., Шиманська Т.В., Надточій С.М. Фактор, який вивільнюється під час реперфузії ішемізованого серця, дослідження впливу на міокард, коронарні та периферичні судини // Фізіол. ж.-2002.- 48, №1.-С.3-8.
2. Сагач В.Ф., Вавілова Г.Л., Струтинська Н.А., Акопова О.В. Вплив індукторів та інгібіторів мітохондріальної пори на її утворення та на вивільнення неідентифікованого мітохондріального фактора// Фізіол. ж.-2003.-49, №1.-С.3-12.
3. Сагач В.Ф., Шиманська Т.В., Надточій С.М. Фактор, який вивільнюється під час реперфузії ішемізованого серця, може бути маркером відкриття мітохондріальної пори // Фізіол. ж.- 2003.- 49, №4.- С.6-12.
4. Brookes P., Salinas E., et al. Concentration-dependent effect of nitric oxide on mitochondrial permeability transition and cytochrom c release. // J. Biol. Chem. - 2000. - 275. - P.20474-20479.
5. Brown G. Nitric oxide and mitochondrial respiration // Biochim. Biophys. Acta. - 1999. - 1411. - P.351-369.
6. Kim Y-M., Talanian R., & Billiar T. Nitric oxide inhibits apoptosis by preventing increases in caspase-3-like activity via two distinct mechanisms // J. Biol. Chem. - 1997. - 272. - P.31138-48.
7. Paxinou E., Weisse M., Chen O., et al. Dynamic regulation of metabolism and respiration by endogenously produced nitric oxide protects against oxidative stress// Proc Natl. Acad. Sci USA.- 2001.- 98, 20.-P.11575-80.

8. Piantadosi C., Tatro L., and Whorton A. Nitric oxide and differential effects of ATP on mitochondrial permeability transition//Nitric Oxide. - 2002. - 6,1.-P.45-60.
9. Zorov D.B., Filburn C.R. et al. Reactive oxygen species (ROS)-induced ROS release:a new phenomenon accompanying induction of the mitochondrial permeability transition in cardiac myocytes//J.Exper.Med.- 2000.-192,N7.- P.1001-14.

## **ЭНДОТЕЛИЙЗАВИСИМАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ФУНКЦИИ КОРОНАРНЫХ СОСУДОВ ПРИ РАЗЛИЧНОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К СТРЕССУ**

**Щербинин И.Ю. Солодков А.П.**

*Витебский государственный медицинский университет,  
г.Витебск*

Aim of investigation - to study the poststress changes of coronary circulation in rats with various resistance to stress and to determinate the degree of nitric oxide participation in theses processes by means of blockade its synthesis by concurrent inhibitor L-NAME.

•The experiments have been conducted on 112 white female rats, which have divided on 2 groups ("active" and "passive") based on their behavior in the "open field" test.The new data about endothelium system of nitric monoxide synthesis contribution in the development of stress – induced reduction of coronary autoregulation in animals sensitive to stress has been received in the basis of which the endothelium dysfunction of coronary vessels accompanied with the NO hyperproduction has laid.

The power of local system of nitric monoxide depends on the individual – typological peculiarities of animal behavior together with the different expression of stress – reaction may contribute in the stress – resistance of heart and vessels has been detected.

Одним из следствий эмоционального стресса является изменение функций сердечно – сосудистой системы. Стресс может способствовать возникновению артериальной гипертензии, гипотензии, перестройке сосудистой стенки, оказывая свое влияние непосредственно на гладкие мышцы, вплоть до выраженного спазма коронарных сосудов и развития инфаркта миокарда. Несмотря на однородность стрессорного воздействия не у всех животных развиваются изменения артериального давления, сосудистого тонуса или работы сердца, т.е. наблюдается выраженная индивидуальная устойчивость к стрессу [3]. Подобная чувствительность